

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): MATSUMURA, et al.
Serial No.: Not yet assigned
Filed: February 9, 2004
Title: METHOD AND APPARATUS FOR CELL RECOVERY
Group: Not yet assigned

LETTER CLAIMING RIGHT OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

February 9, 2004

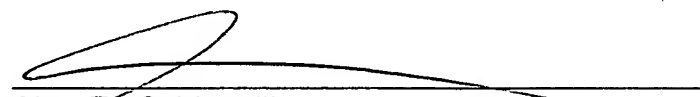
Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on Japanese Patent Application No.(s) 2003-281978, filed July 29, 2003.

A certified copy of said Japanese Application is attached.

Respectfully submitted,

ANTONELLI, TERRY, STOUT & KRAUS, LLP


Alan E. Schiavelli
Registration No. 32,087

AES/alb
Attachment
(703) 312-6600

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 7 月 2 9 日
Date of Application:

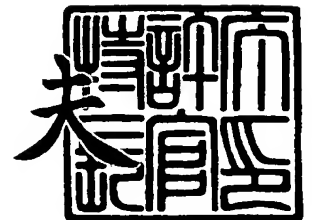
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 2 8 1 9 7 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 2 8 1 9 7 8]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社日立製作所
 国立がんセンター総長

2 0 0 3 年 1 1 月 1 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 3 5 9 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 H300789
【提出日】 平成15年 7月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 5/08
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県柏市柏の葉 6 丁目 5 番 1 号 国立がんセンター研究所支所
がん治療開発部内
【氏名】 松村 保広
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県柏市柏の葉 6 丁目 5 番 1 号 国立がんセンター研究所支所
がん治療開発部内
【氏名】 松下 尚之
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2 5 2 0 番地 株式会社 日立製作所
基礎研究所内
【氏名】 角田 弘之
【発明者】
【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社 日立製作
所 中央研究所内
【氏名】 原田 邦男
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2 5 2 0 番地 株式会社 日立製作所
基礎研究所内
【氏名】 岡野 和宣
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2 5 2 0 番地 株式会社 日立製作所
基礎研究所内
【氏名】 永井 啓一
【発明者】
【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地 株式会社 日立製作所
医療システム推進本部内
【氏名】 野口 清輝
【特許出願人】
【識別番号】 000005108
【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所
【特許出願人】
【識別番号】 590001452
【氏名又は名称】 国立がんセンター総長
【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 10,500円
【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成14年度新エネルギー・産業技術総合開発機構（再）委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）：国等以外のすべての者の持分の割合 50 / 100

【提出物件の目録】

【物件名】	特許請求の範囲	1
【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【包括委任状番号】	9003115	

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

採取された自然排出便に、室温で、バッファ液が添加された試料を準備するステップと、
前記不純物が除去された試料中のがん細胞を、固体担体に吸着させるステップと、
前記吸着したがん細胞を回収するステップ
とを有することを特徴とするがん細胞回収方法。

【請求項 2】

更に、前記試料について、フィルタを用いて不純物を除去するステップを有することを
特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 3】

前記がん細胞回収の全工程を温度管理無しに行うことを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 4】

前記不純物が除去された試料中のがん細胞を、固体担体に吸着させるステップと、及び
前記吸着したがん細胞を回収するステップも、室温で行うことを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 5】

前記バッファ液は、血清が含まれていることを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 6】

前記バッファ液の量は、前記糞便の量の等倍以上であることを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 7】

前記固体担体の表面には、上皮系細胞及び／又は上皮系癌細胞の表面抗原に対する抗体が固定化されていることを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 8】

前記固体担体は、磁気ビーズであり、前記回収は磁石を用いて行うことを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 9】

前記室温は、15℃以上35℃以下であることを特徴とする請求項 1 に記載のがん細胞回収方法。

【請求項 10】

バッファ液と糞便とからなる試料を室温で収容するバッグと、
前記試料中の細胞を吸着させるための固体担体が収容された容器と、
を有することを特徴とする細胞回収装置。

【請求項 11】

前記バッグと連結して設けられた、前記試料中の不純物を除去するフィルタ部を有し、
前記試料中の細胞を吸着させるための固体担体が収容された容器が、前記フィルタ部と連結して設けられたことを特徴とする請求項 10 に記載の細胞回収装置。

【請求項 12】

前記フィルタ部は、1枚又は粗さの異なる複数のフィルタで構成されていることを特徴とする請求項 11 に記載の細胞回収装置。

【請求項 13】

前記容器には、前記固体担体または前記試料の少なくとも一方を攪拌させるための攪拌手段が設けられていることを特徴とする請求項 10 に記載の細胞回収装置。

【請求項 14】

前記固体担体は磁気ビーズであり、前記容器周辺に、更に回収用磁石が設けられていることを特徴とする請求項 10 に記載の細胞回収装置。

【請求項 15】

前記細胞回収装置は、温度管理手段を有さないことを特徴とする請求項 1 0 記載の細胞回収装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞回収方法及び細胞回収装置

【技術分野】

【0001】

本発明は糞便から細胞を回収する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

欧米では、大腸がんが癌死亡率の上位を占めている。日本でも大腸がんの患者数は近年急激に増加している。これは日本人の食生活が欧米型の肉食が中心となったことに原因があると考えられている。国内では毎年約6万人程度が大腸がん罹患しており、臓器別の死亡数でも、胃がん、肺がんが続く3番目の多さであり、今後のさらなる増加も予想されている。しかしながら、大腸がんは他のがんと異なり、早期がんであれば手術により、100%近く治せることが知られている。従って、大腸がんは早期がん検診の対象となり、数多くの検査法が考案されてきた。

【0003】

大腸がんの早期発見のための検査法として注腸検査や内視鏡検査などが行なわれている。注腸検査とはバリウムを大腸内に注入し、大腸の粘膜面に付着させ、その表面の凹凸をX線により調べる方法である。内視鏡検査は大腸の中を直接内視鏡で調べる方法である。これらの検査法は大腸がんの発見に対して、高い感度と特異性を有している。加えて、内視鏡検査では早期がんや前がん状態のポリープを切除できる利点も有している。しかし、これらの検査法は被験者への負担が大きく、コストも高い、特に内視鏡検査では操作に熟練を要し、合併症のリスクを伴っている。そのため、無症状の一般人を対象にした大腸がん検査には向いていない。

【0004】

そこで、一般人の大腸がん一次スクリーニング法として、便潜血検査が広く利用されている。便潜血検査とは糞便に含まれるヘモグロビンの存在を調べることにより、腸内の出血の有無を診断し、間接的に大腸がんの発生を予測する方法である。

【0005】

便潜血検査法には大きく分けて化学的検査法と免疫検査法の2種類が存在する。化学的便潜血検査法とは、ヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性を利用した方法であり、基質として加えられた過酸化水素が分解される際に生じた活性酸素により、濾紙に含まれたグアヤックが、青緑色の酸化グアヤックに変わる反応を利用している。ヘモカルトII濾紙（藤沢薬品）や、シオノギB濾紙（塩野義製薬）などが市販品として検査に使用されている。

【0006】

免疫的便潜血検査とは主に、抗ヒトヘモグロビン抗体の特異的なヒトヘモグロビンへの結合を利用しており、その特異性の高さから、現在では便潜血検査法の主流になりつつある。逆受身無血球凝集法（イムディアHem-Sp、富士レオビ）、磁性粒子凝集傾斜法（マグストリームHem-Sp、富士レオビ）、ラテックス凝集法（イムノカルト、中外製薬）などが知られている。

【0007】

このように広く大腸がん検査に利用されている便潜血検査だが、検査の有用性に対しては疑問の声も上がっている。ヘモカルトIIを使用した化学的便潜血反応で陽性判定になるには大腸内で1日当たり20mgの出血が必要だが、実際の大腸がん患者の出血は10mg以下であると考えられている。そのため、便潜血反応の感度は26%程度であり、実際の大腸がん患者のおよそ1/4しか発見できず、3/4を見逃しているとの報告もある（下記非特許文献1）。更に、陽性判定被験者の中で実際に大腸がんであったのは8.3%に過ぎず、多くの擬陽性を含んでいる。

【0008】

そこで、より精度の高い新しい一次スクリーニング用検査法の開発が切望されている。

その候補として、糞便中に剥離したがん細胞を利用した検査法に注目が集まっている。大腸がんに伴い、間接的に起こる腸内の出血を調べる便潜血検査法に比べて、本方法は直接がん細胞を調べるため、より信頼性の高い検査法になりうると考えられる。

【0009】

糞便中のがん細胞を調べる検査法では、糞便から直接抽出した核酸を利用して遺伝子診断を行なう方法が下記特許文献1等に報告されている。具体的な遺伝子変異検出法としては、シーケンス法、PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction enzyme fragment length polymorphism) 法、SSCP (single-stranded conformational polymorphism) 法、PTT (protein truncation test) 法などが開発されている。遺伝子変異の検出以外にもマイクロサテライトの不安定性 (MSI, microsatellite instability) や long DNA (L-DNA) の出現などを指標に診断を行なう方法が知られている。

【0010】

遺伝子変異の診断の対象となる遺伝子として、K-ras, APC, p53, DCC等が広く知られている。遺伝子の発現量の違いに目を付けた、新たな診断の対象となりうる遺伝子の探索はマイクロアレイ等を利用して現在でも活発に行なわれている。CD44遺伝子のスプライシングバリエーションの発現パターンをマーカーとする方法なども提言されている。

【0011】

これらの検査法で問題になるのは、糞便中には様々な細菌や正常細胞由来の核酸が存在しており、糞便から回収されるがん細胞由来の遺伝子の割合が非常に微量 (約 0.05%) であるという事である。これはがん細胞由来遺伝子の変異や微妙な発現パターンの変化を調べる際に大きな妨げとなり、これらの方法の実用化を困難にしている。

【0012】

そこで、より確実な大腸がん診断に向けて、糞便から直接がん細胞を回収し、診断する方法が考えられている。糞便からがん細胞を回収するためには、2つのステップが重要である。ひとつは糞便中に存在する細胞を糞便から解離するステップであり、もう一つは解離した細胞を回収するステップである。

【0013】

下記特許文献2には、糞便から細胞を解離するステップで糞便を冷却し、糞便の表面下に存在する細胞を解離させる前処理法が報告されている。具体的には、特許請求の範囲第1項に、『便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程』を必須とするとの記載があり、この方法では冷却して氷結した糞便の表面を削り取り、糞便表面下に存在するがん細胞を解離させるものである。また、ストマッカーと呼ばれる固形物をマイルドに粉砕できる装置を使い、糞便全体を懸濁し、細胞を解離させる方法も報告されている。

【0014】

解離した細胞を回収するステップでは、パーコールを利用した遠心分離法 (下記非特許文献2) や、抗ヒト抗体を結合させた磁気ビーズを利用した回収法 (下記非特許文献3) が報告されている。中でも上皮系細胞特異的に結合する Ber-EP4 抗体を結合させた磁気ビーズは市販されており (Dynabeads Epithelial Enrich, ダイナル社)、大腸がん細胞株に結合することが知られている。下記特許文献2でも Ber-EP4 結合磁気ビーズが糞便からのがん細胞の回収に利用されている。

【特許文献1】特表 2002-515973 号公報 (WO 97/28450)

【特許文献2】特表 平 11-511982 号公報 (WO 97/09600)

【非特許文献1】Jama, Vol.269, 1262-7, 1993

【非特許文献2】Int J Cancer, Vol.52, 347-50, 1992

【非特許文献3】Lancet, Vol.359, 1917-9, 2002, Apmis, Vol.110, 239-46, 2002

【非特許文献4】Gastroenterology, Vol.114, 1196-1205, 1998

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

一般人を対象にした大規模な大腸がん検査では、自動化システムによる多検体の大量処理が必要である。糞便から直接細胞を回収し大腸がんの検査を行なう方法は、その信頼性において非常に優れた方法である。しかし、上記特許文献2に開示されたように、冷却によって氷結させた糞便の表面から細胞を回収する既存の方法（以下、「冷却法」という）では操作が煩雑であり、大規模検査を行なうことができない。

【0016】

自動化に向けた多検体の大量処理には操作時間の短縮と簡略化が必要である。冷却法では遠心分離のステップが存在する。遠心分離は時間がかかる上に、自動化を行なうことができず、多検体処理を困難にする。更に検体の冷却操作は自動化において、装置を大掛かりなものにし、糞便処理操作を煩雑にする。

糞便から回収した細胞を用いた大腸がんの判定では細胞学的分析を行い、大腸がんを同定する方法が非常に有効である。ところが従来の冷却法では冷却操作により細胞にダメージを与え、細胞学的分析を困難にする。

【0017】

更に、冷却法では糞便表面下の細胞を剥離させ回収している。小腸に近い上行結腸部位では糞便は泥水状であり、大腸壁から剥離したがん細胞はその後の有形便の形成過程で糞便中に取込まれると考えられる。そのため、冷却法では上行結腸由来のがん細胞を回収できない可能性が高い。

【課題を解決するための手段】

【0018】

上記の課題を解決するために、本発明では、がん細胞回収方法及び細胞回収装置を、室温で操作するものとした。

即ち、従来の、冷却して氷結した糞便の表面を削り取り、糞便表面下に存在するがん細胞を解離させる方法（冷却法）と相違し、本発明の細胞回収方法は、室温で、バッファ液が添加された試料を準備するステップと、前記不純物が除去された試料中のがん細胞を固体担体に吸着させるステップと、前記吸着したがん細胞を回収するステップを有するものである。これにより、がん細胞回収の全工程を温度管理無しに行うことが可能である。同様に、本発明の細胞回収装置は、バッファ液と糞便とからなる試料を室温で収容するバッグと、試料中の細胞を吸着させるための固体担体が収容された容器とを有する。これにより、細胞回収装置は、温度管理手段を有さないことが可能である。この結果、本発明の細胞回収方法及び装置は、細胞回収操作を簡便にするとともに、糞便中のがん細胞を安定した状態で高効率に回収でき、高い判定精度が得られるものである。

【0019】

図1に、糞便中の細胞安定度及び抗原-抗体結合反応速度の温度依存性を示す。図1に示されるように、温度が低いと糞便中の細胞安定度は低下し、特に、4℃以下の氷結した状態では、がん細胞が死滅する恐れがあり、以後の細胞学的分析を困難にする。一方、抗原-抗体結合反応速度は、高温になるに連れて抗体が失活し、やはり以後の免疫学的操作を困難にする。そこで、本発明では、両者を両立させるために、室温付近、具体的には5℃～40℃、好ましくは15℃～35℃の温度範囲を採用することを特徴とする。なお、がん細胞の回収から吸着までの全工程を室温で行える。

【0020】

更に、本発明では糞便全体の懸濁液が利用できる新たなフィルタシステムの開発を行なった。漏斗型のフィルタは糞便懸濁液のろ過を効率化し、操作時間の短縮をもたらすと同時に遠心分離の操作を排除し大幅な操作の簡略化を可能にする。更に糞便の中心部を含んだ全体から細胞を回収するため、全大腸を対象にしたがん診断を可能にするものである。一方、多段式フィルタのろ過装置では膜上に細胞をトラップし、細胞を濃縮することも可能である。細胞をトラップした膜を回収することにより、自動化システムへの適応を可能にするものである。

さらに糞便懸濁液中に血清を加えるなどプロトコルの条件検討を行い、全工程を室温で操作できる簡便化プロトコルの開発を行なった。

【発明の効果】**【0021】**

従来の上記特許文献2に開示された、冷却して氷結した糞便の表面を削り取り、糞便表面下に存在するがん細胞を解離させる方法（冷却法）と相違し、本発明の細胞回収方法及び装置により、室温で糞便から良好な生きたがん細胞を回収することが出来るようになり、回収細胞の細胞学的、免疫学的、生化学的分析を高い精度で行なうことが可能になった。又、本発明の細胞回収方法及び装置により、早期大腸がん由来の細胞や、全部の便を検体とすることにより、内視鏡検査で発見が困難な上行結腸由来のがん細胞を回収することができるため、非常に信頼性の高い検査法を提供することが可能になった。更に、遠心操作、冷却操作を本方法及び装置から排除し、大幅な操作の簡便化と時間の短縮をもたらし、本方法及び装置を利用した大腸がん検査の自動化トータルシステムの構築を可能にした。

【発明を実施するための最良の形態】**【0022】****<糞便からの細胞回収>**

本発明である糞便からの細胞回収法の標準化プロトコルを図2に示す。以下、標準化プロトコルの手順に沿って説明する。

【0023】**（ステップ1：検体回収）**

本発明に用いる糞便はヒト自然排泄便を使用する。糞便は固体状の形を保ったものを使用し、下痢便は使用しない。また被験者が下剤等の強制排出薬や腸検査用のバリウム等を使用した後に排泄した糞便は使用しない。事前に被験者が特別な食事制限をする必要性はない。

【0024】

検体用糞便は皿状またはシート状の使い捨て可能な容器上に回収し、適量をストマッカーバッグに入れたものを使用する。他にも糞便の回収は、ステック式糞便回収装置やスタンブ式回収装置など、適量の糞便が回収可能な方法であれば適用可能である。ストマッカーバッグは市販のフィルタ無しバッグを使用する。フィルタ付きストマッカーバッグも使用出来る。ここで言うストマッカーとは袋状の容器に入った検体を破碎するミキサーの一般名称であり、ストマッカー用の袋とはストマッカー用に市販された専用の袋を指すが、ストマッカーに使用可能な袋であれば他の代用品であっても適用可能である。

【0025】

被験者から回収した糞便は3時間以内に使用することが望ましいが、およそ10時間まで使用出来る。この間検体糞便は室温で保存することが可能であり、検体糞便を冷蔵もしくは冷凍する必要はない。

使用する糞便の量は5gから80g程度が望ましいが、およそ0.5gから200gまで使用出来る。

【0026】

糞便を回収したストマッカーバッグには懸濁用のメディウムを加える。メディウムにはHanks液を使用する。しかし、一般的に細胞を扱う実験で使用するメディウムであれば使用出来る。具体的な例として、PBS、PBS（-）、各種細胞培養用メディウム（MEM、DMEM、RPMI）などを挙げることができる。

【0027】

加えるメディウムの量は糞便の量や状態により変える事が可能である。しかしながら、糞便1g当たり1ml以上が望ましい。ストマッカーバッグ1袋当たり、200mlのメディウムを加えれば上記のすべての便量に対応できる。

メディウムには血清を加える。血清濃度は10%が望ましいが0.5～20%程度でも可能である。血清の種類はFBS (fetal bovine serum) が望ましいがCS (calf serum) でも使用できる。

【0028】

メデイウムが加えられた糞便入りストマッカーバッグはシーラーを用いて密閉する。この時ストマッカーバッグを2重にして用いれば、懸濁液の漏れをより完璧に防ぐことが可能である。密閉したストマッカーバッグはストマッカーを用いて処理し、糞便懸濁液を作製する。この検体回収のステップは、室温で行った。但し、検体の回収から過までに時間を要する場合には、クーラーボックス等で冷却保管しておいても良い。

【0029】

(ステップ2:ろ過)

懸濁液はドラフト内で、フィルタを使用してろ過し、残渣物を取り除く。フィルタ付きストマッカーバッグを使用した場合はバッグ内のフィルタを用いて懸濁液をろ過して、ろ液を回収する。

フィルタのないストマッカーバッグを使用した場合には新たなフィルタ装置を使用して、懸濁液をろ過する。

【0030】

フィルタ装置のフィルタは単独もしくは様々な口径をもつフィルタを並べた多段式で使用する。単独で使用する際のフィルタの口径は $500\mu\text{m}$ 程度が望ましいが、 $40\sim1500\mu\text{m}$ 程度、好ましくは $400\sim1000\mu\text{m}$ が適応可能である。多段で使用する場合は口径の大きいフィルタから小さいフィルタへ順番に懸濁液を流していく。多段ろ過用のフィルタの口径は $40\sim2000\mu\text{m}$ 程度が適応可能である。また多段式フィルタの最終フィルタの口径を $10\mu\text{m}$ 以下にすることにより、細胞を最終フィルタ上に捕らえることが可能である。

【0031】

フィルタ装置は自然落下式また吸引ろ過式のどちらでも適用可能である。フィルタの形状の一例を図3に示す。例えば、図3のフィルタの仕上がり形状が、開口部直径: 60mm 、底部直径: 20mm 、高さ: 200mm で、容器挿入時の挿入高さ: 170mm のものが例示される。図3に示したものは、側面にもフィルタが存在する漏斗型立体型フィルタである。しかし、ろ過面が底面のみである底面型フィルタでも適用可能である。更にフィルタ面を凹凸のあるひだ状にすることにより、懸濁液との接触面積を増やした形状に変えることも可能である。

フィルタの材質はナイロン製が望ましい。しかし他にも適切な口径や形状のフィルタを作製できる材質ならば適用可能である。具体的な例としては、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレンなどが挙げられる。このろ過ステップは、室温で行った。

【0032】

(ステップ3:磁気ビーズ反応)

ろ液中に含まれるがん細胞を、がん細胞にアフィニティーをもった担体を用いて回収する。担体にはがん細胞に対するアフィニティーを持った抗体が表面に結合した磁気ビーズを使用する。具体的にはダイナル社から市販されているBer-Ep4抗体結合磁気ビーズ(Dynabeads Epithelial Enrich、ダイナル社)を使用する。Ber-Ep4以外にも大腸がん細胞に対するアフィニティーを持った抗体ならば適応可能である。抗体以外にも大腸がん細胞にアフィニティーのあるアプタマー、リガンドなどが使用できる。

分注したろ液が約 $20\sim45\text{ml}$ 入ったチューブ一本当たり、 $40\mu\text{l}$ の磁気ビーズを加える。磁気ビーズの量は $20\sim400\mu\text{l}$ 程度の範囲で変えることが可能である。

磁気ビーズを加えたろ液はミックスローターを用いて混和し、ろ液中の細胞を磁気ビーズに結合させる。混和は室温もしくは 4°C のコールドルーム内で行なうことが望ましい。混和時間は30分間以上が望ましい。この磁気ビーズ反応のステップは、室温で行った。

【0033】

(ステップ4:磁気分離)

混和したろ液入りチューブは磁気スタンドに設置した後、15分間振とうし、磁気ビーズをチューブ側面に集める。振とう時間は10分間以上が望ましい。振とう方法はシーソー運動、回転、旋回など、ろ液が緩やかに混和する条件であれば問題ない。

磁気ビーズが壁面に付着した後、ろ液は取り除く。ろ液除去後、磁気スタンドからチュ

ーブを外し、上記メEDIUMで洗浄し、ビーズ洗浄液を回収する。メEDIUMの量はチューブ当たり $500\mu\text{l}$ 使用するが、次の実験を想定して、任意に量を変動させることが出来る。この磁気分離のステップは、室温で行った。

【0034】

(ステップ5: 磁気分離, エッペンチューブ)

洗浄液は先に使用したチューブよりも小型のエッペンチューブ等に回収する。洗浄液の入ったチューブは直ちに専用磁気スタンドに設置し、エッペンチューブの側壁に磁気ビーズを集めた後、上清を除去し、細胞-ビーズ複合体のペレットを得る。この磁気分離、エッペンチューブのステップは、室温で行った。

【0035】

<大腸がん診断>

本標準化プロトコールで回収したペレットは、続いて大腸がん判定用の検体として使用する。がんの判定には細胞そのものを利用する場合と細胞から抽出した物質を利用する場合がある。細胞そのものを利用する場合は回収後、直ちに使用する。抽出物質を利用する場合は -80°C にペレットを凍結保存することが可能である。

【0036】

細胞そのものを利用する場合はパパニコロウ染色により、細胞を染色し、顕微鏡で観察し判定する。細胞質に対する核の比率 (N/C 比) が高く、クロマチンが凝集した異型性の細胞が確認できた場合、がん細胞であると判定を下す。染色法はその他にもがん細胞を同定できるものであれば適応可能である。一般染色以外にもがん細胞特異的抗体を利用した免疫染色が適応可能である。

【0037】

細胞からはDNAもしくはRNAを抽出して、がん判定に利用することが可能である。DNA、RNAの抽出には各社から発売されている核酸抽出キットが使用出来る。具体的にはDNAの抽出にはダイナル社の Dynabeads DNA DIRECT Universal, キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit、三光純薬社のセパゾンなどが挙げられる。RNAの抽出にはニッポンジーン社の ISOGEN, インビトロジェン社の TRIzol Reagent などが挙げられる。抽出した核酸は従来技術の項で示したような様々な方法に利用できる。

【0038】

<糞便処理トータルシステム>

本システムを応用した糞便処理トータルシステムの概念を図4に示す。収集された検体はストマッカーを用いて懸濁する。懸濁液をろ過する装置は、図4に示した様な単独の漏斗型フィルタを並べた形の装置が適用できる。また多段式のフィルタ装置に置き換えることも可能である。更に本ろ過装置には吸引ろ過機能が付いている。ろ液は分注し、ビーズを添加した後、攪拌する。攪拌装置は既存の製品の転用あるいは多検体処理に適応した装置を使用する。磁気分離には既存の磁気スタンドもしくは、磁力を強めた多検体同時処理対応スタンドを使用する。

回収した細胞-ビーズ複合体を用いてがん判定を行なう。がんの判定には細胞からの抽出物あるいは細胞自身を利用する。DNAチップやプロテインチップを利用した発現解析あるいはフローサイトメトリーを利用したがん細胞の同定などの検査法を適応して自動化システムを構築する。

【実施例】

【0039】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

<糞便からの細胞の回収>

手術前の大腸がん患者由来糞便を検体として使用した。糞便の使用に関しては事前に被験者へ実験内容の説明を行い、同意を得た。

糞便 (約 $5\sim 80\text{g}$) が入ったストマッカーバッグに 200ml の 10% FBS 含有 H

a n k s 液 (ニッスイ) を入れ、シールした後、ストマッカーを用いて (200 rpm, 1 min) 糞便の懸濁液を作成した。

【0040】

フィルタ付きストマッカーバッグを使用した場合はバッグ内のフィルタを用いて懸濁液をろ過した。フィルタがないストマッカーバッグを使用した場合は筒状プラスチック容器にセットした漏斗型フィルタに懸濁液を通してろ過し、ろ液をビーカーに回収した。ろ液は更に、50 ml の遠沈管 5 本に分注した。

遠沈管一本当たり、40 μ l の B e r - E P 4 抗体結合磁気ビーズ (Dynabeads Epithelial Enrich、ダイナル社) を加え、ミックスローター (VMR-5、AS ONE 社) を用いて混和し (4℃、60 rpm、30 分間)、ろ液中の細胞を B e r - E P 4 抗体に結合させた。

【0041】

各遠沈管を磁石スタンド (Dynal MPC-1、ダイナル社) にセットした後、マイルドミキサー (SI-36、TAITEC 社) 上に横向きに置き、15 分間シーソー運動を行い (60 往復/1 分間)、ろ液を混和し、磁気ビーズを遠沈管側壁へ集めた。

ろ液を除去した後、遠沈管をスタンドから外し、一本当たり 500 μ l の 10% FBS 含有 H a n k s 液を加えて、壁面に集められたビーズを洗浄した。

ビーズを含んだ洗浄液をあらかじめ 500 μ l の 10% FBS 含有 H a n k s 液が入れたエッペンチューブ (1.5 ml 用) 5 本に回収した。軽く懸濁後、磁石スタンド (Dynal MPC-S、ダイナル社) にセットし、エッペンチューブの側壁に磁気ビーズを集めた。

【0042】

洗浄液を除去した後、エッペンチューブをスタンドから外し、一本当たり 1 ml の 10% FBS 含有 H a n k s 液を加えて、壁面に集められたビーズを洗浄した。同様に、チューブを磁石スタンドにセットし、エッペンチューブの側壁に磁気ビーズを集めた後、上清を除去して、細胞-ビーズ複合体のペレットを得た。この回収は、室温で行った。

【0043】

<回収細胞の細胞学的分析>

実施例 1 で回収したチューブ 1 本分の細胞-ビーズ複合体ペレットに YM 固定液 100 μ l を加えて懸濁した後、50 ml の遠沈管に移し、YM 固定液で全量 25 ml にして細胞含有固定液を作成した。細胞含有固定液をスライドグラス 8 枚分のオートスメア装置に分注し、更に YM 固定液を加えて装置を固定液で満たした後、2000 rpm で 10 分間遠心して、スライドグラスに細胞を塗抹した。スライドに冷風を当てて乾燥させた後、95% エタノールで固定した。

細胞形態観察用の代表的な染色法であるパパニコロウ染色法により、細胞を染色し、がん細胞の有無を顕微鏡で観察して判断した。その結果を表 1 に示した。

【0044】

【表1】

No.	腫瘍部位 ¹⁾	Dukes分類	細胞診	備考 ²⁾
1	S	C	+	
2	Ra	B	+	
3	S	A	-	ニフレックによる下痢
4	Rb	C	-	ニフレックによる下痢
5	Rb	D	-	フィルターのつまり
6	S	A	-	フィルターのつまり
7	Ra	C	+	
8	Rb	A	+	
9	Rb	A	+	
10	Ra	A	+	
11	Rs	A	+	
12	Ra	A	+	
13	Rb	A	+	
14	A	A	+	
15	S	C	+	
16	T	A	+	

1) S:S状結腸 Ra:上部直腸 Rb:下部直腸 Rs: 直腸S状部 A:上行結腸 T: 横行結腸

2) No.1-12: フィルター付きストマッカー使用、No.13-16: 漏斗型フィルター使用

【0045】

表1は、本実験で使用した検体の提供先である大腸がん患者の症例を示すものであり、細胞診(+)は本方法でがん細胞が回収された症例を示すものであり、細胞診(-)は本方法でがん細胞が回収された症例を示すものである。

【0046】

No. 3, 4の症例では、糞便回収前に患者が下剤であるニフレックを服用したため、回収糞便が下痢状になり、細胞が回収されなかった。No. 5, 6の症例でも細胞は回収されなかった。この2例では糞便量が100gを超えた上、この時点ではフィルタ付きストマッカーバッグを使用して糞便懸濁液をろ過していたため、著しいフィルタの詰まりが見られた。フィルタの目詰まり具合に応じて、細胞回収率が低下することは予備実験からも明らかであり、極度のフィルタへの目詰まりは細胞の回収を妨げる原因となることが明らかになった。

【0047】

このように、全部で16症例中12例(75%)で細胞を回収することができた。細胞が回収されなかった症例においても上記のように、回収出来なかった理由は明白であった。従って本プロトコールに沿った磁気ビーズ法を用いると、大腸がんの患者から非常に効率的に細胞を回収できることが判明した。

【0048】

検体の提供を受けた大腸がん患者の進行度を調べると、細胞が回収された12例中8例(67%)はDukes Aの早期がんに分類されるものであった。加えて腫瘍部位が上行結腸(No. 14)や横行結腸(No. 16)であるDukes Aの症例からも、細胞を回収することが出来た。以上のことから、本方法は内視鏡検査等で発見が困難な部位に発生したがんを含んだ早期がんの診断に非常に有効であることが判明した。

【0049】

<培養細胞を用いた磁気ビーズ細胞回収法の条件検討>

幼児糞便懸濁液に大腸がん培養細胞株(HT-29)を混合し、Ber-EP4抗体結合磁気ビーズと反応させ、本法における細胞回収率に影響を与える条件を調べた。

幼児糞便懸濁液は上記漏斗型フィルタに通したろ液を使用した。回収効率は回収したビーズに結合した細胞をNucleo Counter (M&S TechnoSystems社)を用いて計測し、始めに懸濁液に加えた細胞数と比較し計算した。

【0050】

始めにビーズと細胞の結合に適した温度を検討した。磁気ビーズと細胞を反応させる温度は通常4℃で行なうことが多い。これは細胞に与えるダメージを下げるため、あるいは検体中に含まれるマクロファージがビーズを捕食する現象を防ぐためなどの理由による。

【0051】

そこで、25mlの細胞(8.4×10⁵個)－糞便懸濁液と40μlのビーズの混和反応を、4℃と室温の2種類で行なった。その結果、室温でも4℃の時と同様の細胞回収率を得られることが判明した(図5A)。これは本方法では細胞回収の全ステップを室温で行なうことが可能であることを意味しており、上記の冷却法に比べて、大幅に各操作を簡略化することが出来た。

【0052】

次に懸濁用培養液中の血清の必要性に関して検討した。血清には溶液中に含まれるプロテアーゼ活性を抑制し細胞を安定させる働きや、非特異的な細胞の吸着を防ぐ働きなど、磁気ビーズ法を効率的に進める作用を有していることが予想された。

【0053】

そこで、10%の血清(FBS, fetal bovine serum)を含むHank's液と血清を含まないHank's液を使用して調製した25mlの細胞－糞便懸濁液を40μlのビーズと反応させ、同様に細胞の回収率を調べた。

その結果(図5B)、血清を含まない場合、細胞の回収率が低下し、本回収法における血清の有効性が示された。

【0054】

さらに本実験に用いる漏斗型フィルタのメッシュの口径に関する検討を行なった。図3に示した形状で、全面がメッシュ状の、異なる口径の(1000, 512, 96, 48μm)ナイロンフィルタを作製した。糞便懸濁液に同様に培養細胞を加え、上記4種類のフィルタを用いてろ過後、ビーズと反応させ細胞の回収率を調べた。

【0055】

その結果、512μmのフィルタに比べて、96μmではおよそ1/2, 48μmではおよそ1/5に回収率が低下していた。なお、1000μmのフィルタを用いた場合は、回収率が512μmのフィルタとほぼ同程度であった。これにより、フィルタの口径としては、500以上が好ましいことが分った。なお、フィルタとしての作用を有するためには、1500μmを上限とすると好ましい。

【0056】

<パーコール遠心分離法との比較>

従来法であるパーコール遠心分離法と磁気ビーズ法の細胞回収率を比較した。実験は上記と同様に培養細胞を用いて行なった。パーコール遠心分離法は上記非特許文献4に報告されたYamaoらの方法に準じて行なった。パーコール遠心分離法とは、パーコール液に細胞を混ぜ、遠心分離することにより、細胞をその密度により分離する方法である。その結果を図6に示す。パーコール遠心分離法では細胞回収率が0.8%であった。一方、磁気ビーズ法(標準化細胞回収プロトコルに準じる)では回収率が66.7%であり、磁気ビーズ法の有利性を示す結果であった。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】糞便中の細胞安定度及び抗原－抗体結合反応速度の温度依存性を示すグラフである。

【図2】糞便からの大腸がん細胞回収法の標準化プロトコルの模式図である。

【図3】糞便懸濁液をろ過する漏斗型フィルタの形状を示す図である。

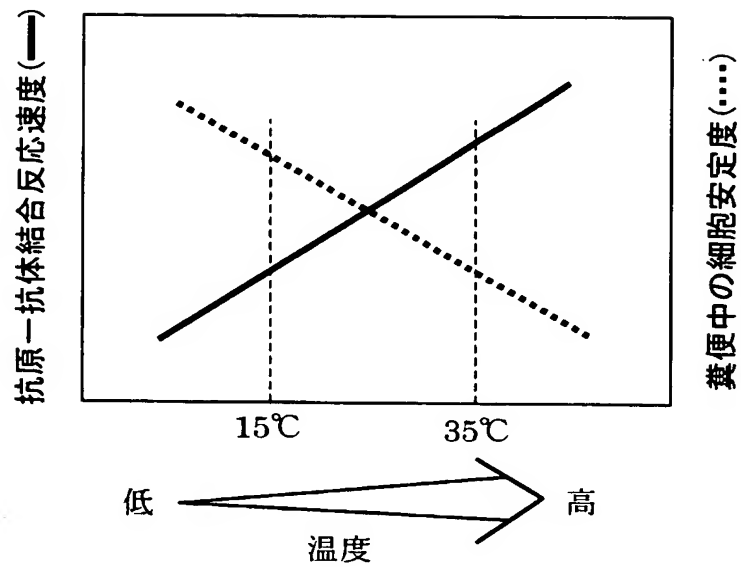
【図4】本発明を利用した大腸がん検査のトータルシステムの概念図である。

【図 5】細胞回収法の条件検討を行なった結果を示す図である。A は細胞と磁気ビーズの結合温度と細胞回収率の関係を示した図である。B はメディウム中の血清の有無と細胞回収率の関係を示した図である。

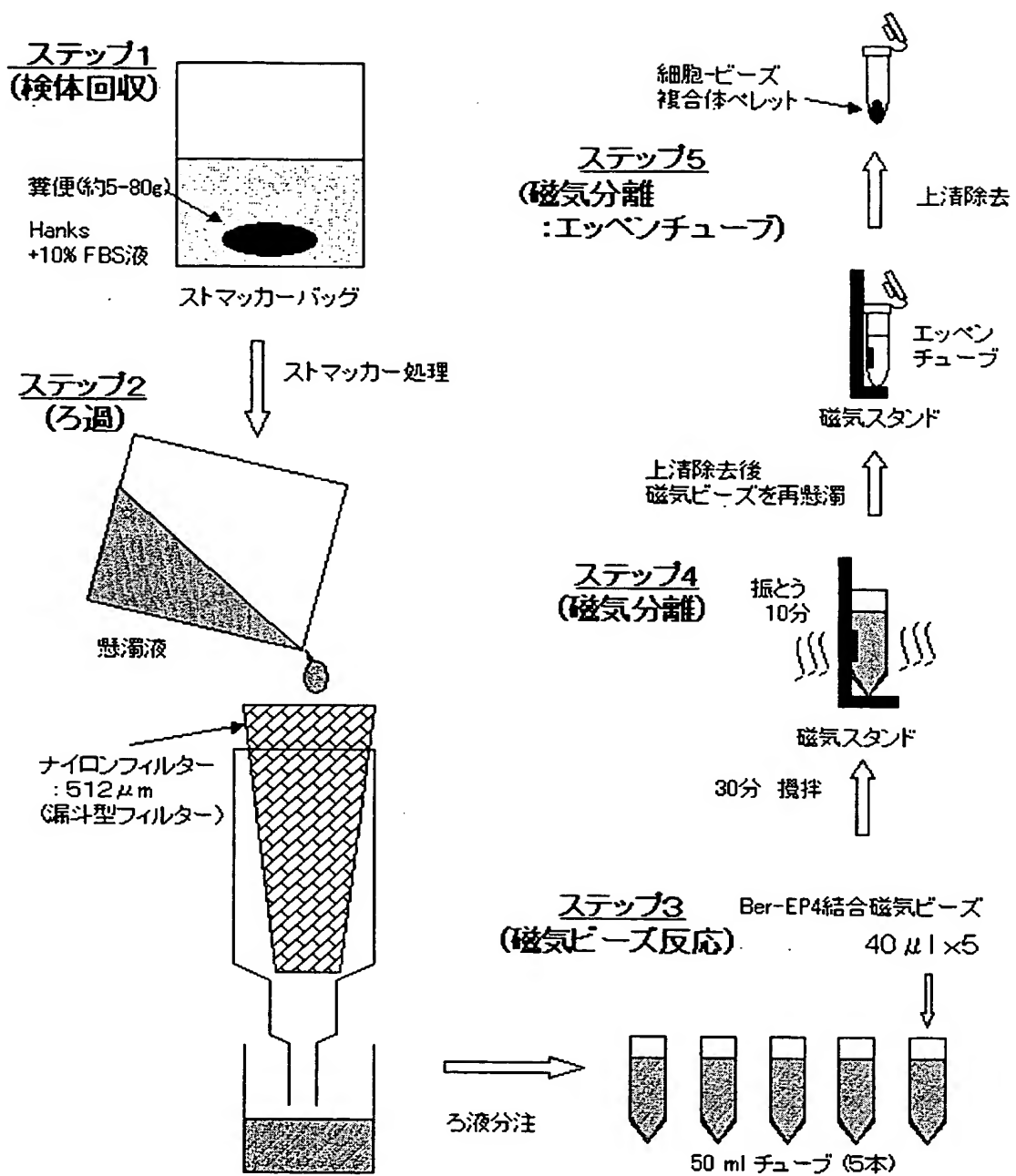
【図 6】従来法と本法である磁気ビーズ法の細胞回収率を比べた図である。

【書類名】 図面

【図 1】



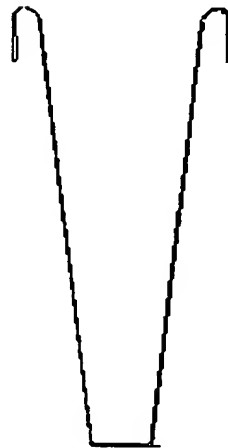
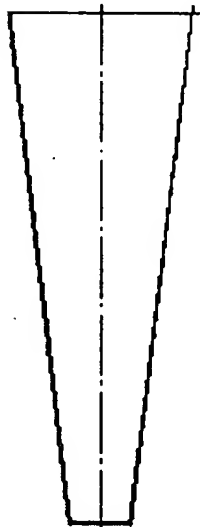
【図2】



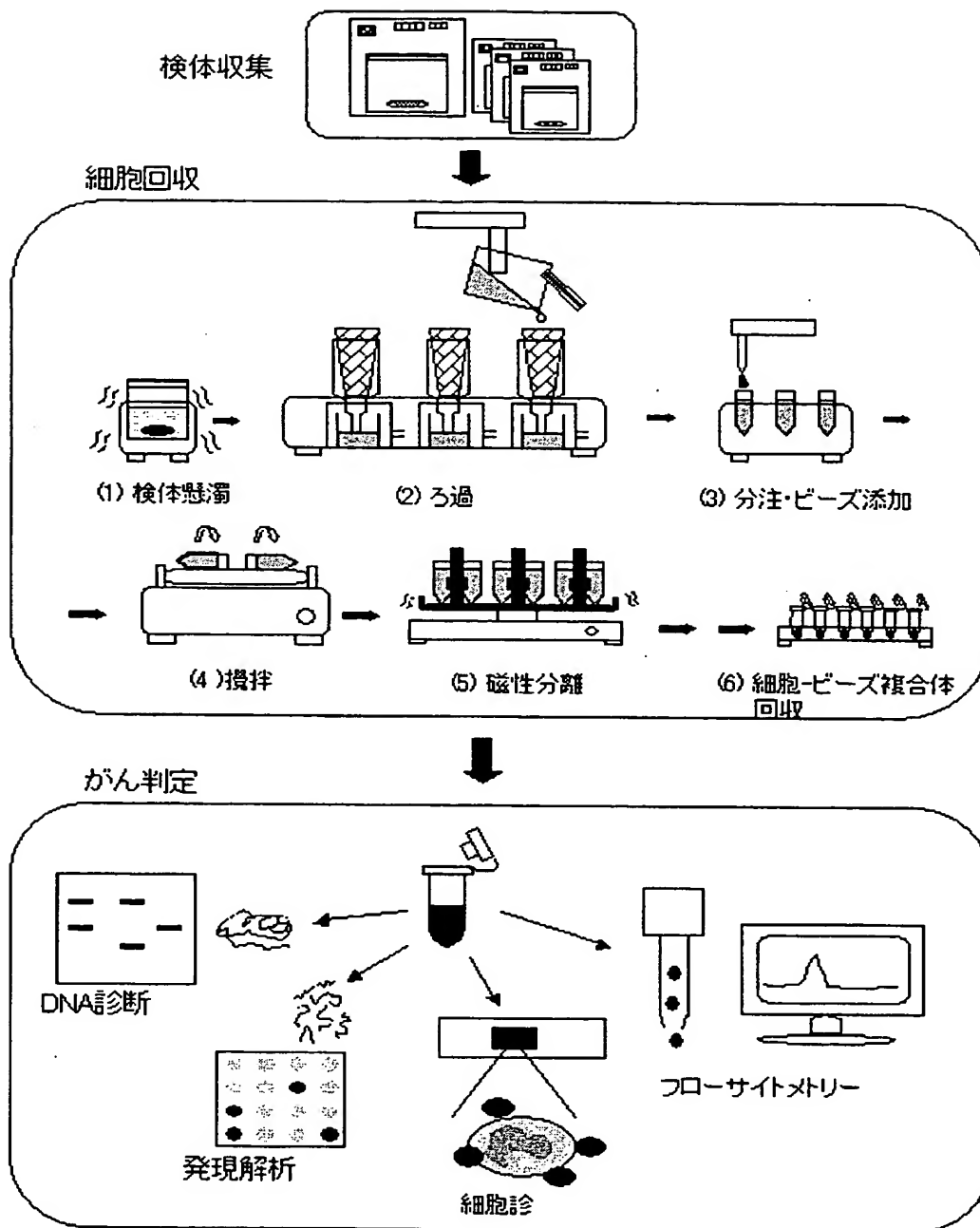
【図 3】

仕上がり形状

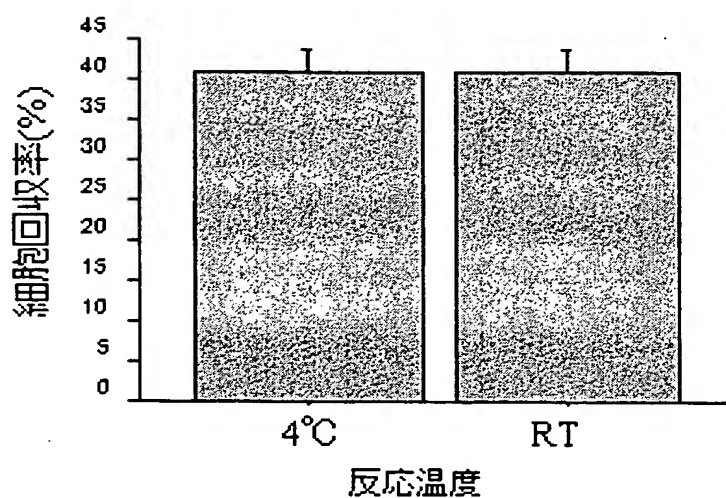
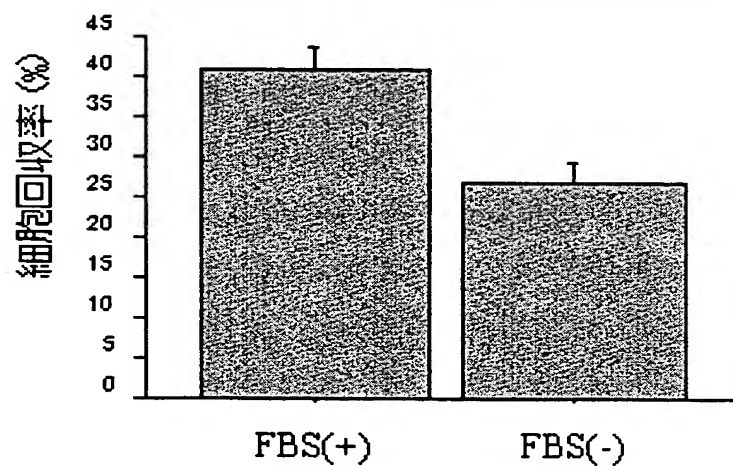
容器挿入時形状



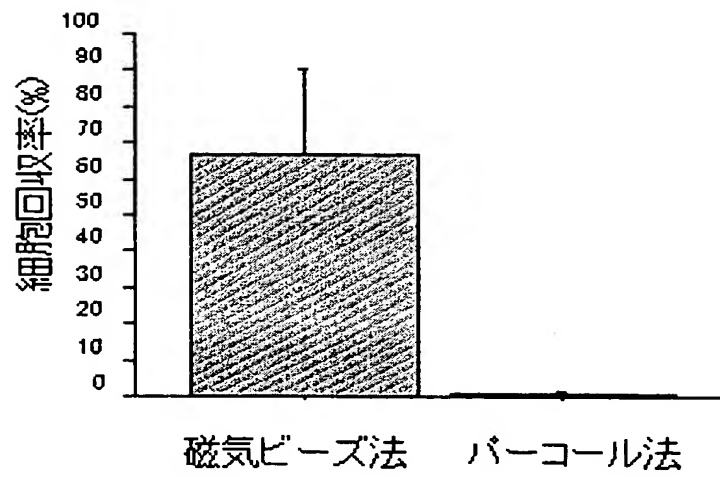
【図 4】



【図 5】

A 細胞と磁気ビーズの反応温度と細胞回収率**B** 糞便懸濁液中の血清の有無と細胞回収率

【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多検体の自然排泄便から大腸がんの診断をするために、糞便から細胞を回収する方法及び装置を提供する。

【解決手段】 採取された自然排出便に、室温で、バッファ液が添加された試料を準備するステップと、前記不純物が除去された試料中のがん細胞を、固体担体に吸着させるステップと、前記吸着したがん細胞を回収するステップとを有することを特徴とするがん細胞回収方法、及び細胞回収装置。

【選択図】 図 4

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 H300789
【提出日】 平成15年 9月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-281978
【補正をする者】
 【識別番号】 000005108
 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所
【補正をする者】
 【識別番号】 590001452
 【氏名又は名称】 国立がんセンター総長
【代理人】
 【識別番号】 100091096
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 平木 祐輔
【手続補正1】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 発明者
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県柏市柏の葉 6 丁目 5 番 1 号 国立がんセンター研究所支所
 がん治療開発部内
 【氏名】 松村 保広
 【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県柏市柏の葉 6 丁目 5 番 1 号 国立がんセンター研究所支所
 がん治療開発部内
 【氏名】 松下 尚之
 【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2 5 2 0 番地 株式会社 日立製作所
 基礎研究所内
 【氏名】 角田 弘之
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社 日立製作
 所 中央研究所内
 【氏名】 原田 邦男

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-281978
受付番号	50301489602
書類名	手続補正書
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成 15 年 10 月 20 日

< 認定情報・付加情報 >

【補正をする者】

【識別番号】	000005108
【住所又は居所】	東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地
【氏名又は名称】	株式会社日立製作所

【補正をする者】

【識別番号】	590001452
【住所又は居所】	東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号
【氏名又は名称】	国立がんセンター総長

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100091096
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門 1 丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	平木 祐輔

特願 2 0 0 3 - 2 8 1 9 7 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 1 0 8]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区神田駿河台 4 丁目 6 番地

氏 名

株式会社日立製作所

特願 2003-281978

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[590001452]

1. 変更年月日

1990年12月12日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区築地5丁目1番1号

氏 名

国立がんセンター総長